

46-
86-

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

AT #21

EQUIVALENT TO EP 0 296 413

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

ABSTRACT

(11)Publication number : 64-085096

(43)Date of publication of application : 30.03.1989

(51)Int.Cl.

C12P 21/02

C07K 13/00

C07K 15/12

C12N 15/00

// A61K 37/465

(C12P 21/02

C12R 1:91)

(21)Application number : 63-140558

(71)Applicant : HOECHST JAPAN KK

(22)Date of filing : 09.06.1988

(72)Inventor : IWASAKI WAKAKO
TAKAHASHI MIKIKO
HASHIMOTO TAMOTSU

(30)Priority

Priority number : 62145293 Priority date : 12.06.1987 Priority country : JP

(54) HYBRID HUMAN PROTEIN C AND BIOTECHNOLOGICAL SYNTHESIS THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce hybrid human protein C having strong action to inhibit blood clotting, by replacing a part of the amino acid sequence of human protein C with the amino acid sequence of a protein depending on blood-clotting vitamin K.

CONSTITUTION: The amino acid sequence containing Gla domain of human protein C is substituted with the amino acid sequence containing the Gla domain of the protein depending on human blood-clotting vitamin K through the biotechnology using DNA coding the vitamin K-dependent protein to give the hybrid protein in which the No.1 through No.43 amino acids are replaced with the amino acid sequence from No.1 to No.43 in prothrombin, human blood-clotting factors VII, IX or X.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-85096

⑤ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和64年(1989)3月30日
C 12 P 21/02		C-6712-4B	
C 07 K 13/00		8318-4H	
15/12		8318-4H	
C 12 N 15/00		A-8412-4B	
// A 61 K 37/465	ACB	8615-4C	
(C 12 P 21/02)			
C 12 R 1:91)			
審査請求 未請求 請求項の数 9 (全19頁)			

⑬ 発明の名称 雑種ヒトプロテインCおよびその遺伝子工学的製法

⑭ 特 願 昭63-140558

⑮ 出 願 昭63(1988)6月9日

優先権主張 ⑯ 昭62(1987)6月12日 ⑰ 日本(JP) ⑱ 特願 昭62-145293

⑲ 発 明 者 岩 崎 和 佳 子 東京都杉並区上井草3-9-1 道灌ハイツ405

⑲ 発 明 者 高 橋 美 樹 子 埼玉県蓮田市綾瀬1-11

⑲ 発 明 者 橋 本 保 埼玉県朝霞市栄町1-5-10

⑳ 出 願 人 ヘキストジャパン株式会社 東京都港区赤坂8丁目10番16号

㉑ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

明 細 書

1. 発明の名称 雑種ヒトプロテインCおよびその
遺伝子工学的製法

2. 特許請求の範囲

- 1) ヒトプロテインCのアミノ末端近辺に存在するグルタミン酸残基がガンマカルボキシル化を受けている領域(以下「グラドメイン」と称する)を含むアミノ酸配列が、ヒト血液凝固系のビタミンK依存性蛋白質のグラドメインもしくはそれと同効物を含むアミノ酸配列で置き換わっている雑種蛋白質。
- 2) ヒトプロテインCの1~43番目のアミノ酸配列がプロトロンビン、ヒト血液凝固第Ⅶ、Ⅱ又はX因子の1~43番目のアミノ酸配列で置き換わっている請求項1記載の雑種蛋白質。
- 3) 第X因子の第30番目のアミノ酸バリンがイソロイシンで更に置き換わっている請求項2記載の雑種蛋白質。

4) ヒトプロテインCのグラドメインを含むアミノ酸配列が、ヒト血液凝固系のビタミンK依存性蛋白質のグラドメインもしくはそれと同効物を含むアミノ酸配列で置き換わっている雑種蛋白質をコードするDNA。

5) ヒトプロテインCの1~43番目のアミノ酸配列がプロトロンビン、ヒト血液凝固第Ⅶ、Ⅱ又はX因子の1~43番目のアミノ酸配列で置き換わっている請求項4記載の雑種蛋白質をコードするDNA。

6) 第X因子の第30番目のアミノ酸バリンがイソロイシンで更に置き換わっている請求項5記載の雑種蛋白質をコードするDNA。

7) ヒトプロテインCのグラドメインを含むアミノ酸配列が、ヒト血液凝固系のビタミンK依存性蛋白質のグラドメインもしくはそれと同効物を含むアミノ酸配列で置き換わっている雑種蛋白質をコードするDNAを用いる同蛋白質の遺伝子工学的製造方法。

8) ヒトプロテインCの1~43番目のアミノ酸配

列がプロトロンビン、ヒト血液凝固第Ⅶ、Ⅸ又はⅩ因子の1～43番目のアミノ酸配列で置き換わっている雑種蛋白質をコードするDNAを用いる請求項7記載の同蛋白質の遺伝子工学的製造方法。

- 9) 第Ⅹ因子の第30番目のアミノ酸バリンがイソロイシンで更に置き換わっている雑種蛋白質をコードするDNAを用いる請求項8記載の同蛋白質の遺伝子工学的製造方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

この発明は血液凝固防止作用を有する新規な雑種ヒトプロテインCに関する。

技術的背景

ヒトプロテインCは、ヒト血漿中に存在するセリンプロテアーゼ前駆体である。

ヒトプロテインCはトロンボモジュリンに結合したトロンビンにより限定分解を受け、活性型プロテインCとなり、血液凝固系の第Ⅶa因子および第Ⅸa因子をカルシウムイオンの存在下に失活

逆に血液凝固的に作用するものとして、プロトロンビン、血液凝固第Ⅶ、Ⅸ及びⅩ因子(以下それぞれ「第Ⅶ因子」「第Ⅸ因子」及び「第Ⅹ因子」という)が知られている。

さらに興味深いことに、この第Ⅹ因子のアミノ末端から1～43のアミノ酸残基からなるペプチドは、第Ⅹ因子を拮抗的に阻害し、結果的に血液凝固抑制的に作用することが、Navroth等によって報告されている(Thrombosis Research 44, 625-637 (1986))。

本発明の課題

本発明の課題は、ヒトプロテインCのアミノ酸配列の一部をヒト血液凝固系のビタミンK依存性蛋白質のアミノ酸配列の一部で置換しより高い血液凝固阻害活性を有する新しい雑種蛋白質を提供することである。

発明の構成

本発明は、ヒトプロテインCのグラドメインを含むアミノ酸配列がヒト血液凝固系のビタミンK依存性蛋白質のグラドメインもしくはそれと同効

させ血液凝固を阻害することが知られている。

ヒトプロテインCの生産をコードする遺伝子の塩基配列は1985年にFosterらによって決定され、その結果ヒトプロテインCのアミノ酸配列も決定された(D. C. Foster et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4673-4677 (1985))。

ヒトプロテインCはアミノ末端から6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26及び29位にグルタミン酸残基を有し、これらは翻訳後ビタミンK依存性の修飾(モディフィケーション)によって、そのガンマ位の炭素がカルボキシル化されている。そのγ-カルボキシグルタミン酸を含む領域(以下本明細書で「グラドメイン」と称する)は、主として、カルシウムイオン(Ca²⁺)を介して、細胞膜上の負に荷電したリン脂質と複合体を形成する際に働くと考えられている。このグラドメインの働きについては文献「代謝」第19巻、第9号(1982)に詳しい総説がのべられている。一方、ヒトプロテインCと同じくビタミンK依存性のヒト血漿蛋白質であるが、ヒトプロテインCの作用とは

物を含むアミノ酸配列で置き換わっている雑種蛋白質に関する。ヒト血液凝固系のビタミンK依存性蛋白質としては、現在プロトロンビン、第Ⅶ、Ⅸ及びⅩ因子が知られている。両者のアミノ末端近辺のアミノ酸配列をDayhoff (1978)の定義によるアミノ酸の物理化学的類似性を考慮にいれて互の配列の相同性が最大となるように並列したもの(alignment)が第1表に示されている。

表中アミノ酸の文字コードは次のとおりである。

A : A l a , N : A s n , S : S e r ,
F : P h e , L : L e u , E : G l u ,
R : A r g , H : H i s , C : C y s ,
I : I l e , D : A s p , K : L y s ,
Q : G l n , V : V a l , P : P r o ,
T : T h r , W : T r p , M : M e t ,
G : G l y , Y : T y r

また*は対応アミノ酸のないことを示す。

表中Eで示されるグルタミン酸残基がγ-カルボキシル化されている。

本発明でいうグラドメインを含むアミノ酸配列

とは、プロテインCでは最少限1～29のアミノ酸を含み、プロトロンビンでは最少限1～32のアミノ酸を含み、第Ⅶ因子では最少限1～35のアミノ酸を含み、第Ⅸ因子では最少限1～40のアミノ酸を含み、第Ⅹ因子では最少限1～39のアミノ酸を含むものを意味する。プロテインCのグラドメインを含むアミノ酸配列を血液凝固系のビタミンK依存性蛋白のグラドメインを含むアミノ酸配列で置き換えるに当っては、第1表のアラインメントにおいて対応する部分を置き換えることが望ましい。

したがって、例えばヒトプロテインCのグラドメインを含むアミノ酸配列をプロトロンビンのそれで置き換える場合、両者のアミノ末端から1～32のアミノ酸配列を置き換えることのみならず、その配列を含む、例えば両者の1～43のアミノ酸配列を置き換えることも可能である。置き換えるべきアミノ酸の数に特に上限はないが通常アミノ末端から50以下とするのが適当と考えられる。

ヒト血液凝固系のビタミンK依存性蛋白のグ

ラドメインと同効物とは、プロトロンビン、第Ⅶ、Ⅸ及びⅩ因子を並列（アラインメント）したとき共通しないアミノ酸をそれぞれの対応アミノ酸で置き換えたものを含む。

たとえば、第Ⅶ因子の3番目のアミノ酸アラニン（Ala）を第Ⅸ因子及び第Ⅹ因子の3番目のアミノ酸であるセリン（Ser）もしくはプロトロンビンの3番目のアミノ酸であるスレオニン（Ser）で置き換えたものが挙げられる。

更にこれらと効果上同等のアミノ酸配列をも含むものである。血液凝固系のビタミンK依存性蛋白のグラドメインで置き換えられるプロテインCのグラドメインのアミノ酸の数は同じとすることが好ましい。しかし、生成物の効果が損われない範囲でそのアミノ酸の数を相違させることも可能である。

本発明の雑種蛋白質は遺伝子工学の手法によって製造される。したがって本発明は該蛋白質をコードするDNA、及び該DNAを用いて遺伝子工学的に該雑種蛋白質を製造する方法にも関する。

本発明の雑種蛋白質をコードする遺伝子は、ヒトプロテインCの遺伝子のうちのリーダシーケンス及びグラドメインを含むアミノ酸配列に相当する塩基配列を、ヒト血液凝固系のビタミンK依存性蛋白のリーダシーケンス及びグラドメインを含むアミノ酸配列に相当する塩基配列で置き換えることによって作成される。この場合、たとえば第Ⅹ因子のリーダシーケンスに相当する塩基配列と第Ⅸ因子のグラドメインに相当する塩基配列を組み合わせることも可能である。

プロテインCをコードする遺伝子の塩基配列等は前述のPoster等の文献に記載されている他、特開昭61-205487号公報に記載されている。更に本発明者等はプロテインCをコードする新しい塩基配列の遺伝子を特願昭62-96341号として出願している。本発明では、これらのいずれの遺伝子を使っても良い。

プロトロンビン、第Ⅶ因子、第Ⅸ因子及び第Ⅹ因子をコードする遺伝子は、それぞれ、*Biochemistry* 22, 2087 (1983), *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 83, 2412 (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6461 (1982) 及び *Biochemistry* 25, 5098 (1986) に記載されている。本発明では、それらの文献に記載された遺伝子配列をもとにして、リーダシーケンス及びグラドメインを含むアミノ酸配列に相当する塩基配列を合成的に作ることが適当である。

このようにして得られた遺伝子は、発現のためのプロモーター等を組み込んで発現ベクターとして常法によって宿主中で発現せられる。宿主としては、蛋白質のグリコシル化、 γ -カルボキシル化あるいは β -ヒドロキシ化等の翻訳後修飾が可能である真核細胞を用いることが望ましい。真核細胞のプロモーターとしてはSV40アーリープロモーター、マウスマンマリー腫瘍ウィルス（MSV）のプロモーター等が挙げられる。

発現のための好ましい宿主細胞としては、CHO細胞やHepG2細胞のような動物細胞が挙げられる。遺伝子の組み換え、発現のために必要とされる機能領域の結合、宿主細胞への形質

転換、発現、生成物の分離精製等はいかなる方法によっても行なうことができる。

発明の効果

本発明で得られる雑種蛋白質は、ヒトプロテインCの本来の作用である第Va因子及び第VIIa因子の失活及びプラスミノゲンアクチベーターインヒビターの中和作用の外に、血液凝固系のビタミンK依存性蛋白質に対する拮抗的阻害効果を有する。したがって、本発明の雑種蛋白質は、プロテインCに比して優れた抗凝固抗血栓作用及び線溶系促進作用を有する。

本発明の実施例においては、本発明者等が特願昭62-96341号特許出願において作成したヒトプロテインCをコードする遺伝子及び特願昭62-96340号特許出願において作成した該遺伝子を組み込んだ発現ベクター並びに蛋白質の遺伝子工学的新しい製造方法を用いた。それらについて略説する。

本発明者等は特願昭62-96341号においてヒトプロテインCをコードする1389bpの遺伝子の両端

に、EcoRI部位とSmaIおよびHind III部位が付加された遺伝子を得た。

この遺伝子は、Foster等がProc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 4673-4677 (1985)において発表したヒトプロテインCの遺伝子配列をもとにして、コードされるアミノ酸を変更しない範囲で塩基配列の一部を変更したものである。

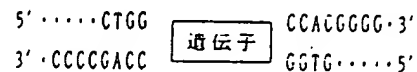
この遺伝子をpUC9(ファルマシア社等より市販)より本発明者等が改良した、pUC9と同じポリリンカー部位と、PvuIIを消失せしめたアンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミドベクターの、EcoRIとHind IIIの間に組み込んでプラスミドpPC1を作成した。このプラスミドは大腸菌K12/O₈ 225に形質転換し、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第1858号(FERM BP-1858)として寄託された。

更に特願昭62-96341号において、このヒトプロテインCをコードする遺伝子から、発現ベクターpCs1が構築された。すなわち、プラスミドpBR322の2.3 KbpのPvuII-EcoRI断片

(これはアンピシリン耐性遺伝子および複製開始部位を含む)に、SV40初期プロモーターを含む断片、遺伝子を挿入するためのポリリンカーおよびSV40初期mRNAポリアデニレーションサイトを含む断片を結合させたプラスミドpSVA stop1をポリリンカー内にあるXbaIサイトで切断しT₄ DNAポリメラーゼにより平滑末端とした。次にpPC1をEcoRIおよびSmaIで消化し、プロテインC遺伝子を含む1.4 KbpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動により単離精製しT₄ DNAポリメラーゼにより平滑末端にした後、先に述べたプラスミドpSVA stop1の平滑末端にT₄ DNAリガーゼによりライゲートした。

組み換えDNAプラスミドを調べてプロテインC遺伝子がSV40初期プロモーターに対して発現可能な方向に組み込まれたクローンを選択しpCs1とした。これは大腸菌K-12 O₈ 225に形質転換し微生物工芸研究所に微工研条寄第1473号(FERM BP-1473)として寄託されており、その制限酵素地図は第1図に示されている。

特願昭62-96340号においては、このpCs1からpCs4が構築されている。このpCs4はSV40アーリープロモーターの上流及びポリAシグナルの下流にBstXIサイトが導入されている。このBstXIサイトは、BstXIで切断されて、その両端に

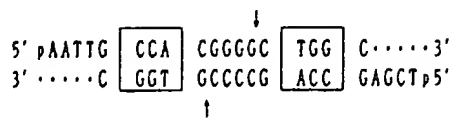


なる非対称的な粘着性末端を生ずるよう工夫されている。そして、このような末端を有する遺伝子を結合させるときは必ず同じ方向に結合する。この性質を利用し、プロテインCの発現に必要な単位(プロモーター+プロテインC遺伝子+ポリAシグナル)を多数個同一方向に結合させたい動物細胞に導入して発現させることによってプロテインCを高収率で生産することができる。

pCs4の製法を以下に略述する。

pCs1をEcoRIで消化した断片に、化学的

に合成された下記の二本鎖オリゴヌクレオチドをライゲートした。



(pはライゲーションのために5'末端に結合したリン酸基、□はBstX Iの認識部位、↑は同酵素の切断部位を示す。)

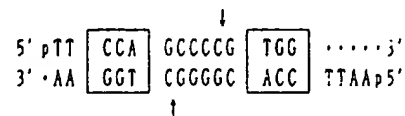
オリゴヌクレオチドの左側は、切断されたpCs 1のEcoR Iによる切断面と結合するが、EcoR Iサイトが再生しない塩基配列としてある。これは次の工程で生ずるEcoR Iサイトがユニークサイトとなるようにするためである。右側はXho Iによる断面と結合する部分である。

ライゲーション産物をXho Iで消化した後再びライゲートした。EcoR Iで切断されたpCs 1の両端に各1個の合成オリゴヌクレオチドが結合し、その両端でライゲートされて(この際Xho Iサイトが生成する)環状のプラスミドとなる。

ライゲーション産物をEcoR Iで消化した後、再びライゲートした。Pvu IIで切断されたプラスミドDNA鎖の両端に各1個の合成オリゴヌクレオチドが結合し、この両端でライゲートして(この際EcoR Iサイトが生成する)環状のプラスミドとなる。得られたプラスミドをXho I及びEcoR Iで切断し、その断片をpHSG 396(宝酒造から購入。クロラムフェニコール耐性のマーカーを持つ)をXho I及びEcoR Iで切断したものにクローニングする。このようにして得られたクロラムフェニコール耐性のプロテインC発現ベクタープラスミドをpCs 4と命名した。その制限酵素地図を第2図に示した。

特願昭62-96340号においては、選択マーカーとしてのネオ遺伝子を有し、pCs 4と同じ非対称性粘着性末端を生ずるBstX Iの認識部位を有するpHSG 293が構築されている。これは先に説明したpCs 4より得られるプロテインCの発現に必要な単位と両者の転写方向が同一方向に結合させることによって、意図する遺伝子が導入さ

つぎに、生じたプラスミドをPvu IIで部分消化する。pCs 1中には2つのPvu IIサイトがあるので、両方で切断されたもの、どちらか一方において切断されたもの、及び全く切断されなかったものの混合物が得られるので、アガロースゲルを用いた電気泳動法によりサイズフラクションして、SV40アーリープロモーターの上流に位置するPvu IIのみが切断されたものを単離する。単離されたDNA鎖に、化学的に合成された下記の化学構造を有する二本鎖オリゴヌクレオチドをライゲートした。

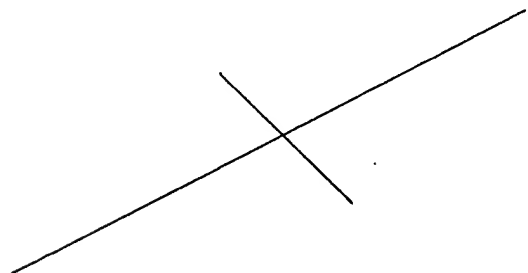


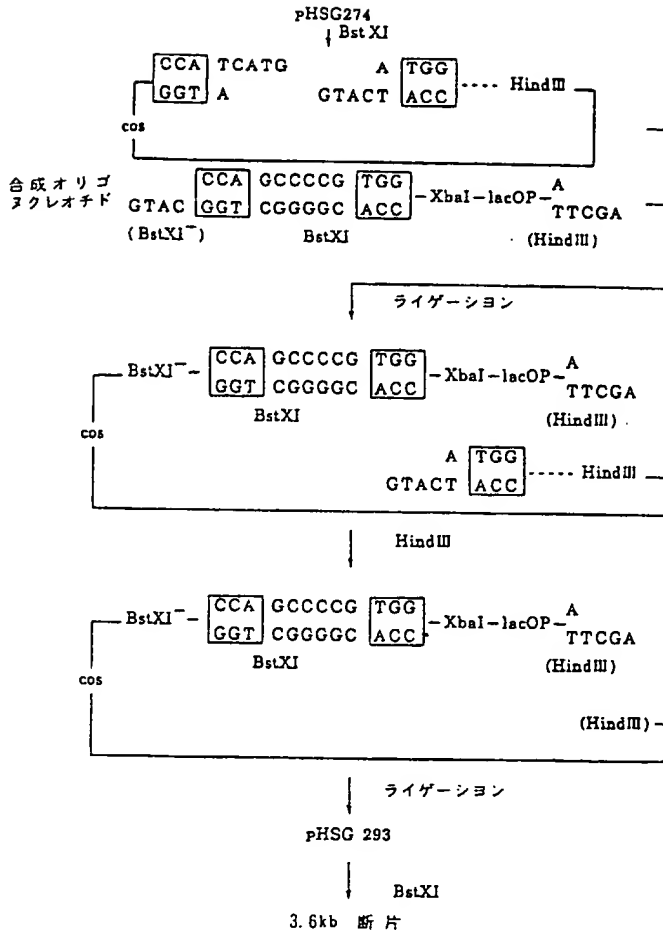
(記号は上記に同じ。右側はEcoR Iによる切断面と結合する部分である。)

オリゴヌクレオチドの左側は、切断されたプラスミドDNA鎖のPvu IIにサイトと結合し、Pvu IIサイトは再生しない塩基配列としてある。

れた形質転換株を選択することを可能にするものである。以下にpHSG 293の製法を以下に略述する。

大腸菌の中ではカナマイシン耐性を示し、真核細胞中ではG418(ジェネティシン)耐性を示すネオ遺伝子が組み込まれているコスミドベクターであって、ATCCに37301として寄託されているpHSG 274をBstX Iで消化すると次のフローシートに示したように切断される。





ビタミンK依存性蛋白質のリーダーシーケンス及びグロブリンの塩基配列を合成的に作成し、pCs4中のプロテインC遺伝子のリーダーシーケンス及びグロブリンに相当する塩基配列をその合成断片で置き換えた。こうして得られた雑種蛋白質の発現用遺伝子単位を、特願昭62-96340号で開発した新しい遺伝子工学的手法によって発現させた。

すなわち、こうして得た雑種蛋白質の発現用遺伝子とpHSG293から得られるネオ遺伝子とをBstXIの非対称性の粘着性末端を利用して同一方向に多数個結合させた。

ついで、この直鎖状の遺伝子を、ファージ粒子でインビトロパッケージングし、大腸菌に感染させた。これをネオ遺伝子に由来するカナマイシン耐性の選択マーカーを利用して選択し、得られたコロニーから目的の組み換え体コスミドDNAをもったものを選択した。このようにして得られた組み換え体コスミドDNAを常法に従ってCHO細胞に導入し、ネオ遺伝子に由来するG418耐性

ついで、その切断された断片をフローシートに示した合成オリゴヌクレオチドとライゲートする。その結果BstXIは消滅する。ついでHindIIIで消化すると、コスミドベクターに含まれているHindIII-BstXI部分及び反復結合した余分の合成フラグメントが除去される。このようにして得られたものをライゲートした。合成オリゴヌクレオチドの左側がコスミドベクター中のHindIIIで切断された切断面と結合した環状プラスミドが得られる。

なお、合成オリゴヌクレオチド中のXbaIはpHSG274とpHSG293を分別するために導入されたものである。合成オリゴヌクレオチド中のlacオペレーターは、コスミドパッケージング後にカナマイシンによる選択と同時に、X-galの存在下にブルーコロニーとなる形質転換株を識別することを可能とする。

このプラスミドをpHSG293と命名し、その制限酵素地図は第3図に示されている。

以下の実施例においては、ヒト血液凝固系の

を利用して選択する。このようにして得られるCHO細胞を培養することによって雑種蛋白質を効率良く生産した。

しかし、本発明の雑種蛋白質は遺伝子工学的なあらゆる方法によって生産することができる。したがって、以下の実施例は雑種蛋白質を製造する一例であって、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

第X因子のグロブリンを含むアミノ酸配列に相当する合成DNAの作成

第2表に示されている、ライゲーションのためのSmaI及びEcoRIサイト、第X因子のリーダーシーケンスに相当する40個のアミノ酸残基、それに続く同蛋白質のアミノ末端から43個のアミノ酸残基、およびヒトプロテインCのアミノ末端から44~46番目のアミノ酸残基に相当する塩基配列よりなる合成DNAを次のように作成した。なお、リーダーシーケンスの先頭のATGの前のAは、遺伝子の発現に好結果を及ぼすことを期待

して付加されたものである。ヒトプロテインCの44~46番目のアミノ酸残基に相当する塩基配列は、そこに含まれるS_aIサイトをヒトプロテインCの遺伝子とのライゲーションに用いる目的で付加されるものである。

表中の塩基配列のHind III, Xba I及びPst Iで分割される4つの断片を得るに必要な合計8本の相補鎖オリゴヌクレオチドを米国アプライド・バイオシステム社 (Applied Biosystem 社) のmodel 380A DNA合成機を用いて合成した。常法によってアニールし、得られた4本の二重鎖フラグメントをHind III, Xba I及びPst IサイトでT4 DNAライゲースによりライゲートした。このようにして得られた両端にS_aIサイトを有するフラグメントを市販のクローニングベクター pUC 18にクローニングして、市販の大腸菌K-12株HB 101中で増幅した。得られたクローニングベクターをS_aIで消化し、常法により精製して目的とする合成DNAを大量に得た。全く同様にして第X因子のアミノ末端から第30

番目のバリンに相当するコドンGTCをATCにかえ、第30番目がイソロイシンに置き換えられている合成DNAを作成した。

実施例 2

プロトロンビン、第VII因子及び第IX因子のグラドメインを含むアミノ酸配列に相当する合成DNAの作成

第3~5表に示されている、ライゲーションのためのS_aI及びEcoR Iサイト、第X因子のリーダーシーケンスに相当する40個のアミノ酸残基、それに続くプロトロンビン、第VII因子又は第IX因子のアミノ末端から43個のアミノ酸残基、およびヒトプロテインCのアミノ末端から44~46番目のアミノ酸残基に相当する塩基配列を有する合成DNAを実施例1と同様に作成される。

実施例 3

雑種蛋白質の発現遺伝子の作成

先に説明したpCs 4をS_aIで消化すると、プロテインCをコードする遺伝子のリーダーシーケンスのすぐ上流にあるS_aI部位及びヒト

プロテインCのアミノ末端から45, 46番目のアミノ酸Val・Aspに該当するS_aI部位で切断される。この間に実施例1で得られた合成DNAを挿入し、大腸菌K-12株HB 101に導入した。目的とする方向に結合されているDNAを含むものを選択し、これをpCs 6と名付け、培養した。こうして得られるプラスミドは第6表に示されているプロテインCと第X因子の雑種蛋白質の遺伝子を有している。

全く同様にして、実施例1で作成された第X因子の第30番目をイソロイシンで置き換えた合成DNA及び実施例2で作成された合成DNAを用いて、雑種蛋白質の発現遺伝子が作成される。

実施例 4

雑種蛋白質の動物細胞における生産とそのプロテインC様活性の確認

実施例3に述べられたpCs 6 DNAをBst X Iで切り出し、アガロースゲル電気泳動によって2.0Kbの大きさのDNA断片を得る。これをBst X Iで消化したpHSG 293 DNAと分子

比20対1で混合しライゲートする。これを大腸菌用のラムダファージパッケージング混合液 (宝酒造より購入) によってパッケージングした。パッケージされた組み換え体ラムダファージを大腸菌O₈ 206 [工業技術院微生物工業技術研究所に微工研発第1472号 (FERM BP-1472) として寄託されている。] に感染させ、これをカナマイシン耐性を選択マーカーとして培養した。生育したコロニーから雑種蛋白質の遺伝子を多く含むものを選択し、大量に培養した後環状コスミドDNAを得た。

この環状のDNAを更にカルシウムフェート法によってCHO細胞に導入しpHSG 293が与える抗生物質G418に耐性となる形質転換株をクローニングし10%のFCS (ギブコ社より購入) および0.1 μ g/ml ビタミンK₃を加えたMEM α 培地 (ギブコ社より購入) 中で以下のように培養する。直径6cmのベトリディッシュに約 1×10^6 の細胞を置き同培地を4ml加え、37℃で一晩培養する。更に培地を新鮮なものに交換し

て24時間更に培養を続ける。この培養上清を回収しELISA法により抗ヒトプロテインC抗体により培地中のプロテインC様抗原量を測定した。

その結果20個のクローンの内5個がそれぞれ420ng/ml、530ng/ml、550ng/ml、910ng/ml、1030ng/mlのイミュノリアクティブなプロテインCを生産していることが確認された。さらに最も生産の高かったクローンについてそのセリンプロテアーゼ活性と抗凝固活性をベーリング・マンハイム山ノ内社製のヒトプロテインC活性測定キット(Cat. No.917435および917567)とベーリング・ベルケ社製のヒトプロテインC抗凝固活性定量キット(Cat. No.2576, 2577, OTX11)を使って測定した。その結果、対照に用いたヒトプラズマのそれぞれ56%及び62%の活性を示した。

実施例 5

雑種蛋白質の精製

実施例4に記載されたヒトプロテインCのグ

ラドメインを第X因子のグラドメインにより置換した雑種蛋白質(以下PcGFXと略称する)を生産する。CHO細胞のうち、抗原量の最も高かった細胞を培養皿(ディッシュ)により培養し、27.5リットルの培養上清を得た。PcGFXはこの培養上清よりKieselの方法(文献: J.Clin.Invest. 64, 761~769 (1979))に従って精製した。即ち、培養上清中のBaCl₂に吸着する画分を再溶解し、さらに40%飽和の硫酸アンモニウムにて沈澱分画し、次いでこの分画を抗ヒトプロテインCモノクローナル抗体アフィニティクロマトグラフに通しPcGFXを吸着させた。この抗体アフィニティクロマトグラフから解離させたPcGFXは95%以上の純度を持ち、蛋白質量としては最終的に4.85mgのPcGFXが得られた。

これらの精製過程を通して、最終的な収量は約30%だった。またアミノ酸の組成解析により、予想されていた1分子当たり13個のGla残基がPcGFX中に存在することが証明された。

実施例 6

PcGFXによる第Va因子の不活性化

血液凝固系における必須のセリンプロテアーゼの一つであり、生体内においてプロテインCにより不活化されることが知られている第Va因子に対するPcGFXの作用を、in vitroの第Va因子による血小板・トロンビン転換活性に対する当該蛋白の阻害作用を指標として測定した。なお標準対照としては天然型プロテインCを用いた。

PcGFX又はプロテインCを、文献 Thromb.Res. 43, 253~264 (1986)に記載された方法に従ってProtac®にて活性化した。つぎに、これらの活性型のPcGFX又はプロテインCの第Va因子に対する作用をComp等の方法(文献 Blood, 54, 1272~1281 (1979))に従って測定した。即ち、ワサギ血小板をトロンビンで活性化し、血小板上に第Va因子を誘導した後、CaCl₂及び、活性化PcGFX又はプロテインCを加え、37℃にて1、5、10又は20分間インキュベートし、さらに第Xa因子とプロトロンビンを加え、トロン

ビンの産生量をそれぞれのインキュベーション時間毎に測定した。以下の表に示すごとく、0.2 unit/mlのPcGFXの第Va因子によるトロンビン生成反応に対する阻害作用は天然のプロテインC(表中では「nプロテインC」)の同じ阻害作用と比較してより強力であった。

インキュベーション時間(分)	トロンビン生成量 (IU/ml)		
	対 照	nプロテインC (0.2 U/ml)	rPcGFX(*) (0.2 U/ml)
0	21.1	14.3	13.4
5	21.8	14.0	6.1
10	21.8	8.3	3.5
20	21.3	4.4	2.5

(*) 組換え PcGFX

実施例 7

PcGFXによる第VIIc因子の不活性化

血液凝固系におけるもう一つの必須のセリンプロテアーゼである第VIIc因子もまた生体内においてプロテインCにより不活化されることが知られている。この第VIIc因子に対するPcGFX

の作用を *in vitro* の第Ⅷc因子による第Ⅹ因子の第Ⅹa因子への活性化に対する当該蛋白の阻害作用を指標として測定した。なお標準対照としては天然型プロテインCを用いた。

PcGFXによる第Ⅷc因子の不活作用の測定は第一化学薬品(株)より購入したTESTZYME® FⅦキットにより行った。PcGFX及び対照となる天然型プロテインCの活性化は実施例6と同様の方法で行った。活性化PcGFX又は天然型プロテインCを第Ⅷc因子と、それぞれ0、15、30、45又は60分間、37℃でインキュベートし、この反応液を1:121に希釈し、次いでリン脂質、第Ⅱa因子、第Ⅹ因子、及びCaCl₂を混合した後、さらに5分以上37℃でインキュベートした。インキュベーション後、カビ社(スウェーデン)より市販されているS-2222を生成した第Ⅹa因子の基質として反応液に加えた。生成した第Ⅹa因子の量は、PcGFX又は天然型プロテインCによる第Ⅷc因子の不活作用の指標となる。以下の表の結果は、第Ⅷc因子に対する

PcGFXの作用が天然型プロテインCとほぼ同等であることを示している。

インキュベーション時間(分)	第Ⅹa因子生成量(%)		
	対 照	nプロテインC	rPcGFX(*)
0	100.0	100.0	100.0
15	87.1	19.6	26.7
30	78.9	5.5	5.5
45	78.0	2.1	1.5
60	76.8	0.0	0.0

(*) 組換え PcGFX

第1表～第6表はそれぞれ次のものを意味する。

第1表はプロトロンビン、第Ⅶ因子、第Ⅱ因子、第Ⅹ因子及びプロテインCのアミノ基末端近辺のアミノ酸配列のアラインメントである。

第2表は、第Ⅹ因子のグラドメインを含むアミノ酸配列に相当する合成DNAの塩基配列である。

第3表はプロトロンビンのグラドメインを含

むアミノ酸配列に相当する合成DNAの塩基配列である。

第4表は第Ⅶ因子のグラドメインを含むアミノ酸配列に相当する合成DNAの塩基配列である。

第5表は第Ⅱ因子のグラドメインを含むアミノ酸配列に相当する合成DNAの塩基配列である。

第6表はプロテインCのグラドメインを第Ⅹ因子のグラドメインで置換した雑種蛋白質をコードする遺伝子とそのアミノ酸配列である。

第 1 表

	10	20	30	40
プロトロンピン	ANT*FLEEVRKGNLERECVETCSYEAEFEALESSTATDVFWAKY			
第Ⅶ因子	ANA*FLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISY			
第Ⅸ因子	YNSGKLEEFVQGNLERECMECKCSFEEAREVFENTTEKTEFWKQY			
第Ⅹ因子	ANS*FLEEMKKGHLERECMEETCSYEAREVFEDSDKTNEFWNKY			
プロテインC	ANS*FLEELRHSSLERECIEEICDFEEAKEIFQNVDDTLAFWSKH			

→第X因子リダーシーケンス

GTCCGACGAAT TCAATGGGCG GCCCACTGCA CCTCGTCCTG CTCAGTGCCT CCCTGGCTGG
 Sal I EcoR I

CCTCCTGCTG CTCGGGGAAG GCTTGTTTCAT CCGCAGGGAG CAGGCCAACA ACATCCTGCC
 Hind III

→第X因子1~43アミノ酸

GAGGGTCACG AGGCGCCAATT CCTTCTCTAGA AGAGATGAAG AAAGGACACC TCGAAAGAGA
 Xba I

GTGCATGGAA GAGACCTGCA GCTACGAAGA GGCCCGCGAG GTCTTTGAGG ACAGCGACAA
 Pst I

→ヒトプロテインC44~467ミノ酸

GACGAATGAG TTCTGGAATA AACACGTCGA C
 Sal I

第 3 表

←第X因子リダーシークエンス

GTCCACGAAT TCAATGGGC GCCCACTGCA CCTCGTCCTG CTCAGTGCTT CCCTGGCTGG
SaI I EcoRI

CCTCCTGCTG CTCGGGGAAA GCTTGTTTCAT CCGCAGGGAG CAGGCCAACA ACATCCTGGC
Hind III

←プロトンペン1~43アミノ酸

GAGGGTCAG AGGCCAACA CCTTCTTGGA CGAGGTGCGC AAGGGCAACC TAGAGCGAGA
Mst I

GTCCGTGGAG GAGACGTGCA GCTACGAGGA GGCCTTCGAG GCTCTGGAGT CCTCCACGGC
Stu I

←ヒトプロテインC44~46アミノ酸

TACGGATGTG TTCTGGGCCA AGCACGTCGA C
SaI I

「第X因子リーダーシーケンス」

GTCGACGAAT TCAATGGGC GCCACTGCA CCTCGTCCTG CTCAGTGCCT CCGTGGCTGG
SaI I EcoR I

CCTCCTGCTG CTCGGGAA GCTTGTTCAT CCGCAGGAG CAGGCCAACA ACATCCTGGC

Hind III

→第Ⅶ因子1~43アミノ酸

GAGGGTCACG AGGCCAAG CGTTCCTGGA GGAGCTGCGG CCGGGCTCCC TGGAGAGGGA
XbaIII

GTGCAAGGAG GAGCAGTGCT CCTTCGAGGA GGCCCCGGAG ATCTTCAAGG ACGCGGAGAG
X_{na} I

γヒトプロテインC44~46アミノ酸

GACGAGCTG TTCTGGATT CT|CACGTCGA C
Sa 1

第 5 表

第X因子リーダーシーケンス
 →
GTCGACGAAT TCAATGGGC GCCCACTGCA CCTCGTCCTG CTCAGTGCCT CCCTGGCTGG
 S α I EcoRI

CCTCCTGCTG CTCGGGGAAA CCTTGTTCAT CCGCAGGAG CAGGCCAACA ACATCCTGGC
 Hind III

第X因子1～437ミノ酸
 →
 GAGGGTCAG AGGTATAATT CAGGTAAATT GGAAGAGTTT GTTCAAGGA ATCTAGAGAG
 XbaI

AGAATGTATG GAAGAAAGT GTAGTTTGA AGAAGCACGA GAAGTTTGT AAAACACTGA

AAAGACAACT GAATTTTGA AGCACGT CCAC
 S α I

ヒトプロテインC44～467ミノ酸
 →

第 6 表

-40		-30
ATG. GGG. CGC. CCA. CTG. CAC. CTC. GTC. CTC. AGT. GCC. TCC. CTG. GCT. GGC. CTC. CTG. CTC. CTC		
Met-Gly-Arg-Pro-Leu-His-Leu-Val-Leu-Ser-Ala-Ser-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Leu-Leu		
-20		-10
GGG. GAA. AGC. TTG. TTC. ATC. CGC. AGG. GAG. CAG. GCC. AAC. AAC. ATC. CTG. GCG. AGG. GTC. ACG. AGG		
Gly-Glu-Ser-Leu-Phe-Ile-Arg-Arg-Glu-Gln-Ala-Asn-Asn-Ile-Leu-Ala-Arg-Val-Thr-Arg		
1	10	20
GCC. AAT. TCC. TTT. CTA. GAA. GAG. ATG. AAG. AAA. GGA. CAC. CAC. CTC. GAA. AGA. GAG. TGC. ATG. GAA. GAG		
Ala-Asn-Ser-Phe-Leu-Glu-Glu-Met-Lys-Lys-Gly-His-Leu-Glu-Arg-Glu-Cys-Met-Glu-Glu		
	30	40
ACC. TGC. AGC. TAC. GAA. GAG. GCC. CGC. GAG. GTC. TTT. GAG. GAC. AGC. GAC. AAG. ACG. AAT. GAG. TTC		
Thr-Cys-Ser-Tyr-Glu-Glu-Ala-Arg-Glu-Val-Phe-Glu-Asp-Ser-Asp-Lys-Thr-Asn-Glu-Phe		
	50	60
TGG. AAT. AAA. CAC. GTC. GAC. GGT. GAC. CAG. TGC. TTG. GTC. TTG. CCC. TTG. GAG. CAC. CCG. TGC. GCC		
Trp-Asn-Lys-His-Val-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Leu-Val-Leu-Pro-Leu-Glu-His-Pro-Cys-Ala		
	70	80
AGC. CTG. TGC. TGC. GGC. CAC. GGC. ACG. TGC. ATC. GAT. GGC. ATC. GGC. AGC. TTC. AGC. TGC. GAC. TGC		
Ser-Leu-Cys-Cys-Gly-His-Gly-Thr-Cys-Ile-Asp-Gly-Ile-Gly-Ser-Phe-Ser-Cys-Asp-Cys		

90
 CGC. AGC. GGC. TGG. GAG. GGC. CGC. TTC. TGC. CAG. CGC. GAG. GTA. AGC. TTC. CTC. AAT. TGC. TCT. CTG
 100
 Arg-Ser-Gly-Trp-Glu-Gly-Arg-Phe-Cys-Gln-Arg-Glu-Val-Ser-Phe-Leu-Asn-Cys-Ser-Leu

 110
 GAC. AAC. GGC. GGC. TGC. ACC. CAT. TAC. TGC. CTA. GAG. GAG. GTG. GGC. TGG. CGC. CGC. TGT. AGC. TGT
 120
 Asp-Asn-Gly-Gly-Cys-Thr-His-Tyr-Cys-Leu-Glu-Glu-Val-Gly-Trp-Arg-Arg-Cys-Ser-Cys

 130
 GCG. CCT. GGC. TAC. AAG. CTG. GGC. GAC. GAC. CTC. CTG. CAG. TGT. CAC. CCC. GCA. GTG. AAG. TTC. CCT
 140
 Ala-Pro-Gly-Tyr-Lys-Leu-Gly-Asp-Asp-Leu-Leu-Gln-Cys-His-Pro-Ala-Val-Lys-Phe-Pro

 150
 TGT. GGC. AGG. CCC. TGG. AAG. CGG. ATG. GAG. AAG. AAG. AGA. TCT. CAC. CTG. AAA. CGA. GAC. ACA. GAA
 160
 Cys-Gly-Arg-Pro-Trp-Lys-Arg-Met-Glu-Lys-Lys-Arg-Ser-His-Leu-Lys-Arg-Asp-Thr-Glu

 170
 GAC. CAA. GAA. GAC. CAA. GTA. GAT. CCG. CGG. CTC. ATT. GAT. GGC. AAG. ATG. ACC. AGG. CGG. GGA. GAC
 180
 Asp-Gln-Glu-Asp-Gln-Val-Asp-Pro-Arg-Leu-Ile-Asp-Gly-Lys-Met-Thr-Arg-Arg-Gly-Asp

 190
 AGC. CCC. TGG. CAG. GTG. CTC. CTT. CTA. GAC. TCA. AAG. AAG. AAG. CTG. GCC. TGC. GGC. GCA. GTG. CTC
 200
 Ser-Pro-Trp-Gln-Val-Leu-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Leu-Ala-Cys-Gly-Ala-Val-Leu

210
 ATC. CAC. CCC. TCC. TGG. GTG. CTG. ACT. GCA. GCC. CAC. TGC. ATG. GAT. GAG. TCC. AAG. AAG. CTC. CTT
 Ile-His-Pro-Ser-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Met-Asp-Glu-Ser-Lys-Lys-Leu-Leu 220

230
 GTC. AGG. CTT. GGA. GAG. TAT. GAC. CTG. CGG. CGC. TGG. GAG. AAG. TGG. GAG. CTG. GAC. CTG. GAC. ATC
 Val-Arg-Leu-Gly-Glu-Tyr-Asp-Leu-Arg-Trp-Glu-Lys-Trp-Glu-Leu-Asp-Leu-Asp-Ile 240

250
 AAG. GAG. GTC. TTC. GTC. CAC. CCC. AAC. TAC. AGC. AAG. AGC. ACC. GAC. AAT. GAC. ATC. GCA. CTC
 Lys-Glu-Val-Phe-Val-His-Pro-Asn-Tyr-Ser-Lys-Ser-Thr-Thr-Asp-Asn-Asp-Ile-Ala-Leu 260

270
 CTG. CAC. CTG. GCC. CAG. CCC. GCC. ACC. CTC. TCG. CAG. ACC. ATA. GTG. CCC. ATC. TGC. CTC. CCG. GAC
 Leu-His-Leu-Ala-Gln-Pro-Ala-Thr-Leu-Ser-Gln-Thr-Ile-Val-Pro-Ile-Cys-Leu-Pro-Asp 280

290
 AGC. GGC. CTT. GCA. GAG. CGC. GAG. CTC. AAT. CAG. GCC. GGC. CAG. GAG. ACC. CTC. GTG. ACC. GGC. TGG
 Ser-Gly-Leu-Ala-Glu-Arg-Glu-Leu-Asn-Gln-Ala-Gly-Gln-Thr-Leu-Val-Thr-Gly-Trp 300

310
 GGC. TAC. CAC. AGC. AGC. CGA. GAG. AAG. GAG. GCC. AAG. AGA. AAC. CGC. ACC. TTC. GTC. CTC. AAC. TTC
 Gly-Tyr-His-Ser-Ser-Arg-Glu-Lys-Glu-Ala-Lys-Arg-Asn-Arg-Thr-Phe-Val-Leu-Asn-Phe 320

330
ATC. AAG. ATT. CCC. GTG. GTC. CCG. CAC. AAT. GAG. TGC. AGC. GAG. GTC. ATG. AGC. AAC. ATG. GTC. TCT
Ile-Lys-Ile-Pro-Val-Val-Pro-His-Asn-Glu-Cys-Ser-Glu-Val-Met-Ser-Asn-Met-Val-Ser

350
GAG. AAC. ATG. CTG. TGT. GCG. GGC. ATC. CTC. GCG. GAC. CCG. CAG. GAT. GCC. TGC. GAG. GGC. GAC. AGT
Glu-Asn-Met-Leu-Cys-Ala-Gly-Ile-Leu-Gly-Asp-Arg-Gln-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser

370
GGG. GGG. CCC. ATG. GTC. GCC. TCC. TTC. CAC. GGC. ACC. TGG. TTC. CTG. GTG. GGC. CTG. GTG. AGC. TGG
Gly-Gly-Pro-Met-Val-Ala-Ser-Phe-His-Gly-Thr-Trp-Phe-Leu-Val-Gly-Leu-Val-Ser-Trp

390
GGT. GAG. GGC. TGT. GGG. CTC. CTT. CAC. AAC. TAC. GGC. GTT. TAC. ACC. AAA. GTC. AGC. CGC. TAC. CTC
Gly-Glu-Gly-Cys-Gly-Leu-Leu-His-Asn-Tyr-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Ser-Arg-Tyr-Leu

410
GAC. TGG. ATC. CAT. GGG. CAC. ATC. AGA. GAC. AAG. GAA. GCC. CCC. CAG. AAG. AGC. TGG. GCA. CCT. TAG
Asp-Trp-Ile-His-Gly-His-Ile-Arg-Asp-Lys-Glu-Ala-Pro-Gln-Lys-Ser-Trp-Ala-Pro-Ter

TAA
Ter

但しTerは終結コード (Termination codon)

